

4/5/1 (Item 1 from file: 351)

B29

3143109 WPI Acc No: 83-03146K/02

YRAM Acc No: C83-003125

Chemically modified peptide(s) with reduced antigenicity in which amino  
gps. are (partially) substd. with a polyethylene glycol-subst.  
triazine substit.

Patent Assignee: (TOYM) TOYODO KK

Number of Patents: 001

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week
JP 57192435	A	821126	8302 (Basic)

Priority Data (CC.No.Date): JP 8177153 (810520):

Abstract (Basic): Modified polypeptide is claimed where all or parts of  
amino gps. in polypeptide molecules are substd. with gp. of formula (I)  
(R1 is F, Cl, OH or gp. inert to the polypeptides:  $-O(CH_2CH_2O)_n-$  are  
polyethylene glycol residue of number-average molecular wt. 5000-15000;  
R2 is alkyl, aromatic gp., alkyl-carbonyl aromatic carbonyl,  
alkylaminocarbonyl or aromatic aminocarbonyl).

Pref. the polyethylene glycol residue has number-average mol.wt.  
5000-15000. and polydispersion degree (mol.wt. distribution) indicated  
by ratio of wt.-average mol.wt. and number-average mol.wt. of lower  
than 1.15.

Prod. maintain high physiological activity of polypeptides such as  
enzymes having physiological activity effective for therapy of patients  
and the others and have reduced or no antigenicity. (9pp)

File Segment: CPI

Derwent Class: A96: B04:

Int Pat Class: A61K-037/48; C07G-007/00; C08H-001/00; C12N-009/00;

Manual Codes (CPI/A-N): A10-E01; A12-V01; B04-B02C; B04-C01; B07-D13;

Plasdoc Key Serials: 0013; 0209; 0210; 0226; 1279; 1588; 1986; 1999; 2000;  
2002; 2014; 2022; 2178; 2180; 2197; 2198; 2207; 2585; 2586; 2672; 2675;  
2766

Polymer Fragment Codes (AM):

\*101\* 013 028 028 062 063 064 147 198 231 239 248 240 250 256 31- 336  
359 525 575 583 589 590 62- 645 688 720 724

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* F012 F014 F016 F580 G010 G040 G100 H5 H521 H541 H589 H601 H602

H621 H8 J011 J231 J271 J521 L462 L463 L910 L999 M423 M510 M521 M530  
M531 M540 M710 M903 V752 V802 V810 V811 V902

Ring Index Numbers: 00212

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁 (JP)  
⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
昭57-192435

⑫ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 08 H 1/00  
A 61 K 37/48  
C 07 G 7/00  
C 12 N 9/00

識別記号

庁内整理番号  
6958-4 J  
7138-4 C  
6956-4 H  
7236-4 B

⑬ 公開 昭和57年(1982)11月26日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 9 頁)

⑭ 修飾ポリペプチド類

⑯ 発明者 鶴沼恒夫

大津市本堅田町1300番地の1

⑰ 特 願 昭56-77153

⑯ 発明者 徳永啓子

⑱ 出 願 昭56(1981)5月20日

滋賀県滋賀郡志賀町小野朝日1  
丁目13番地の1

⑲ 発明者 行松慶二

⑰ 出 願 人 東洋紡績株式会社

大津市本堅田町1300番地の1

⑲ 発明者 広瀬克美

大阪市北区堂島浜2丁目2番8  
号

大津市本堅田町1300番地の1

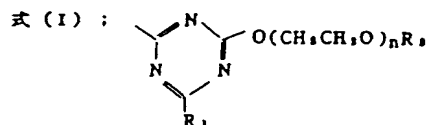
明 細 書

1. 発明の名称

修飾ポリペプチド類

2. 特許請求の範囲

(1) ポリペプチド類の分子中のアミノ基の全部または一部が、



(式中、R<sub>1</sub>はフッ素基、塩素基、水酸基および該ポリペプチド類と実質的に反応しない基を示し、 $-O(CH_2CH_2O)_n-$ は数平均分子量5000~15000であるポリエチレングリコール残基を示し、R<sub>2</sub>はアルキル基、芳香族基、アルキルカルボニル基、芳香族カルボニル基、アルキルアミノカルボニル基または芳香族アミノカルボニル基を示す。)で示される基で置換された修飾ポリペプチド類。

(2) 上記式 (I) に於いて、 $-O(CH_2CH_2O)_n-$

が数平均分子量5000~15000であり、且つ重量平均分子量と数平均分子量の比で表わされる多分散度が1.15以下であるポリエチレングリコール残基である特許請求の範囲第1項記載の修飾ポリペプチド類。

3. 発明の詳細な説明

本発明は患者の治療に有効な生理活性を有する酵素類、その他のポリペプチド類の生理活性を高度に維持しつつ、抗原性を低下または完全に消去せしめた化学修飾ポリペプチド類に関するものである。

酵素類、その他のポリペプチド類の保有する生理活性を利用して、患者の治療に応用しようとする試みは古くからなされている。しかしながら現実にはインシュリン、その他の極く少数例を除いてポリペプチド類を治療薬として応用することは困難であり殆んど実用化されていない。その最も大きな理由として、ポリペプチド類の殆んどが重大なアレルギー反応を引き起す原因となる抗原性を有することが挙げられる。またこのような抗原

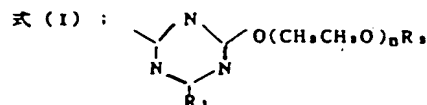
性を有するポリペプチド類の刺激により産生された抗体はポリペプチド類の破壊を引き起し、ポリペプチド類の生体内での存在時間を極めて短くすることにつながる。

特開昭50-42087号公報ではポリペプチド類の免疫性が水溶性ポリマーに依る化学修飾で消去できることが提案されている。ところが、一般にポリペプチド類を高分子量化合物で修飾すると修飾により導入される高分子量化合物の量が増えるに従つて、抗原性が低下する反面、ポリペプチド類が本来有している生理活性もまた低下し、現実には活性のかなり失われたポリペプチド類を使用することを余儀なくされる。例えば、E. コーリ由来のL-アスパラギナーゼについて分子量5000以下の種々水溶性ポリマーを用いて修飾を行なつたところ、オクタロニー、リングテスト等で観察される抗原性を除去する為には、未修飾L-アスパラギナーゼ活性の通常2~3多、好ましい条件下でも10多以下に活性が低下する。従つて活性の損失を出来るだけ少くし、且つ抗原性を

消去せしめ得る条件を採用することが、治療に要するポリペプチド類の量を節約できる上で、この種の化学修飾にとつて極めて重要なポイントとなる。

本発明者等はポリペプチド類の生理活性を高いレベルで保持しつつ、抗原性を消去せしめた化学修飾ポリペプチド類を提供することを目的として鋭意工夫を重ねた結果、本発明に到達した。

即ち本発明は、ポリペプチド類の分子中のアミノ基の全部または一部が、



(式中、 $\text{R}_1$ はフッ素基、塩素基、水酸基および該ポリペプチド類と実質的に反応しない基を示し、 $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ は数平均分子量5000~15000であるポリエチレングリコール残基を示し、 $\text{R}_2$ はアルキル基、芳香族基、アルキルカルボニル基、芳香族カルボニル基、アルキルアミノカルボニル基または芳香族アミノカルボニル基を示す。)

で示される基で置換された修飾ポリペプチド類である。

本発明では修飾により導入されるポリエチレングリコール残基の数平均分子量が上記範囲にあることにより、抗原性が低下または完全に消失しているにもかかわらず、その生理的活性が高度に維持される。従来この種の化学修飾に於ては修飾に用いる高分子量物質の分子量の影響について殆んど検討されておらず、例えば特開昭50-42087号公報では500~5000を好ましい分子量として述べているに過ぎない。

例えば酵母由来のウリカーゼについて修飾により導入されるポリエチレングリコールの分子量の影響について種々検討を行なつた本発明者等の実験結果では、数平均分子量5000以下の場合、リングテスト、オクタロニー等で観察される抗原性を消去せしめた修飾ウリカーゼの未修飾ウリカーゼに対する活性保持率は通常20多以下、好ましい条件下に於ても30多以下にすぎないのである。一方、本発明方法に従つて数平均分子量5000~

15000のポリエチレングリコールで修飾をせしめた修飾ウリカーゼの場合には通常30多以上、好ましい条件下に於ては60多以上の活性を保持したまま抗原性が消去されている。このような分子量の効果は生理活性および抗原性を有する他のペプチド類一般にみられる。

本発明では、さらに修飾により導入されるポリエチレングリコール残基の多分散度が上記範囲にあることにより、抗原性が低下または完全に消失しているにもかかわらず、その生理的活性が高度に維持される。一般に合成高分子は、分子量が均一でなく分子量の異なる種々分子の混合物として存在する為はその分子量に関して服膺をするには多分散度(分子量分布)に関して同時に考慮しておかないと全く意味を持たないことが多い。また同じ平均分子量を保有する高分子化合物で修飾を行なつた場合、分子量分布の広いものを使用すると修飾時に低分子量物質が多く導入される為、抗原性消去に関する効率が低下することが理論的に予測される。しかしながら、このように重要な問

題を含んでいる多分散度に關しては従来から検討された例は全く見当たらない。

本発明者等は上記特定の数平均分子量のポリエチレングリコール残基の多分散度の影響について詳細なる検討を行なつた結果、多分散度が1.15以下であるポリエチレングリコール残基にて分子中のアミノ基が修飾された生理活性ポリペプチド類は本来の生理活性を高いレベルで保持しつつ抗原性が消去されていることを見出した。

例えばE. コーリー由来のL-アスパラギナーゼについて数平均分子量約7000なるモノメトキシポリエチレングリコールから誘導された2-0-メトキシポリエチレングリコール-4,8-ジクロロ-ε-トリアジンを用いて修飾を行なつたところ、モノメトキシポリエチレングリコールの多分散度が1.38の場合、抗原性を消去せしめた修飾L-アスパラギナーゼの活性は未修飾アスパラギナーゼの活性の10%以下に低下しているにも拘らず多分散度が1.03の場合には13%以上の活性を保持している。

ゲル浸透クロマトグラフィー法、光散乱法等が用いられる。また、多分散度を直接的に測定する方法として、ゲル浸透クロマトグラフィー法が挙げられる。

本発明の修飾ポリペプチド類は高い生理活性を保持しつつ抗原性が消去されているという前述の特徴以外に、哺乳動物に投与した場合の生理活性の持続性が従来知られている他のいかなる方法で製造された修飾ポリペプチド類と比較しても優れているという特徴を有している。例えば牛の肝臓由来のカタラーゼについて従来法を用いて修飾を行なつたところ、修飾カタラーゼを無カタラーゼ症のネズミに100パーボレット単位の量を静脈注射した場合、通常3日間、好ましい条件下に於ても5日間以内に血中のカタラーゼ活性が消失してしまうが、本発明の修飾カタラーゼの場合、同じ投与量にも拘らず通常5日間以上、好ましい条件下では7日間以上、最も好ましい条件下に於ては10日間以上にわたつて血中のカタラーゼ活性が持続する。

高分子量化合物の多分散度は

多分散度(d) = 重量平均分子量(Mw) /

数平均分子量(Mn)

で定義され、高分子混合物中に一定分子重量MiのものがNi個あるものとする、Mn、Mwはそれぞれ

$$M_n = \frac{M_1 N_1 + M_2 N_2 + \dots + M_i N_i + \dots + M_n N_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_i + \dots + N_n}$$

$$= \frac{\sum_{i=1}^n M_i N_i}{\sum_{i=1}^n N_i}$$

$$M_w = \frac{M_1^2 N_1 + M_2^2 N_2 + \dots + M_i^2 N_i + \dots + M_n^2 N_n}{M_1 N_1 + M_2 N_2 + \dots + M_i N_i + \dots + M_n N_n}$$

$$= \frac{\sum_{i=1}^n M_i^2 N_i}{\sum_{i=1}^n M_i N_i}$$

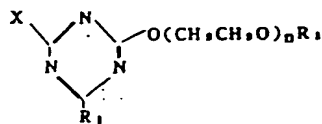
なる式で定義される。

実験的に数平均分子量を求める為には末端基法、ゲル浸透クロマトグラフィー法、氷点降下法、浸透圧法等が用いられ、重量平均分子量の場合には

本発明に於て適用されるポリペプチド類は特に限定されるものでなく本来抗原性と生理活性を有する酵素類、ホルモン類等て且つ分子中にアミノ基を有するものであればいずれでも可能である。そのようなポリペプチド類として例えば、ウリカーゼ、L-アスパラギナーゼ、カタラーゼ、スーパーオキシド・グスミターゼ、アルギナーゼ、トリプシン、フェニルアラニンアンモニリアーゼ、アルドラーゼ、グルタチオンパーオキシダーゼ等の酵素類およびインシュリン等のホルモン類等を挙げることができるが、本発明の効果はこれ等に限定されず発揮される。

本発明の修飾ポリペプチド類は

式(II)：



(式中、Xはフッ素基または塩素基を示し、R<sub>1</sub>はフッ素基、塩素基、水酸基および該ポリペプチド類と実質的に反応しない基を示し、-O(CH<sub>2</sub>

$\text{CH}_2\text{O})_n-$  は数平均分子量 5000~15000 であるポリエチレングリコール誘導体を示し、 $R_1$  はアルキル基、芳香族基、アルキルカルボニル基、芳香族カルボニル基、アルキルアミノカルボニル基または芳香族アミノカルボニル基を示す。) )

なる開鎖を有する化合物の片末端の反応性基をポリペプチド類のアミノ基と反応せしめるよう活性化したポリエチレングリコール誘導体とポリペプチド類とを緩衝液中で混合する方法を用いて容易に得ることができる。反応温度は 2~40℃、反応時間は 0.2~5 時間が通常であり、所定時間経過後限外戸過、カラムクロマトグラフィー等の操作で未反応物を除することにより本発明の修飾ポリペプチド類が得られる。

また、上式で示される活性化したポリエチレングリコール誘導体は、フッ化シアメルまたは塩化シアメルまたはそれ等のモノ置換体もしくはそれ等の適当な割合の混合物を一方の原料とし、酸受容剤の存在下に反応させる通常の方法で容易に合成することができる。この反応はハロゲン基の加

水分解を避ける為に、通常、脱水処理を行なった状態で行われるが、反応時に混入してくる微量の水分により 2 個のハロゲンのうち 1 個が一部加水分解を受けた形で取得されることがよくある。また、修飾反応時に於る反応性を弱める為に適当な条件を用いて、ハロゲン基の一部を意圖的に加水分解したのち修飾反応に供せしめることができる。

更に、上式(II)中、 $R_1$  が X と同じであるジハロ誘導体を用いて修飾反応に供せしめた場合にも、ポリペプチド類の分子中のアミノ基との結合に隣与したハロゲン基以外のハロゲン基は緩衝液により加水分解をうけて一部又は全てが水酸基に変化する。

$R_1$  としては上述のフッ素基、塩素基、水酸基に限られず、ポリペプチド類と実質的に反応しない基であればいずれでも良い。こゝで実質的に反応しない基という表現は、修飾反応時に反応に参加することにより修飾ポリペプチド類を架橋させる原因となる程の反応性を有しないという意味であ

り、架橋をもたらせる程の反応性を有する基の場合は修飾ポリペプチド類を不溶化させる為に好ましくない。ポリペプチド類と実質的に反応しないその様な基として、例えばメトキシ基、エトキシ基、ロープロポキシ基等のアルコキシ基、置換または無置換のフェノキシ基等の芳香族オキシ基、メチルアミノ基、エチルアミノ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、シクロヘキシルアミノ基等のアルキルアミノ基、置換または無置換のフェニルアミノ基等の芳香族アミノ基等を挙げることができる。また、その様な置換基を有する活性化したポリエチレングリコール誘導体の製造は、ハロゲン化シアメルモノ置換体と片末端の封鎖されたポリエチレングリコールとの反応でも得られるが、ハロゲン化シアメルと片末端の封鎖されたポリエチレングリコールとの反応で得られたジハロ化合物に適当な置換基を導入することに依つても得ることができる。

ポリエチレングリコールの片末端の封鎖に用いられる基  $R_2$  としては、ポリエチレングリコールの

末端酸素原子とエーテル結合、エステル結合、ウレタン結合等を介して結合されたものであり、ハロゲン化シアメルまたはモノ置換ハロゲン化シアメルと実質的に応用しない基であることが、活性化したポリエチレングリコール誘導体合成時の複雑な反応を避ける上で必要である。その様な基の例としては、メチル基、エチル基、ロープロピル基、ロープロピル基等のアルキル基、置換または無置換のフェニル基等の芳香族基、アセチル基、プロピニル基等のアルキルカルボニル基、置換または無置換のベンゾイル基等の芳香族カルボニル基、メチルアミノカルボニル基、エチルアミノカルボニル基等のアルキルアミノカルボニル基、置換または無置換のフェニルアミノカルボニル基等の芳香族アミノカルボニル基等を挙げることができる。

$R_1, R_2$  の分子サイズとしては活性化したポリエチレングリコール誘導体の主鎖を構成するポリエチレングリコールの物理化学的性質を変化させる程大きくないことが好ましく、その意味で  $R_1, R_2$

それぞれの抗原の分子量として、通常500以下であることが望まれる。

本発明方法に於ては修飾反応で導入されるポリエチレングリコール抗原の分子量が極めて重要であり、好ましい数平均分子量範囲として5,000~15,000、更に好ましい数平均分子量範囲として6,000~12,000が挙げられる。数平均分子量が15,000を越えると修飾反応時に過激な条件を必要とする為、修飾により抗原性を消去せしめたポリペプチド類の活性保持率が更に低下し、また数平均分子量が5,000以下では効果が十分ではない。

本発明方法の効果を更に効率よく發揮させる為の他の重要な要件は修飾により導入されるポリエチレングリコール抗原の多分散度であり、多分散度が1.15以下であることが好ましく、1.10以下であることが更に好ましい。

本発明の修飾ポリペプチド類は免疫性を低下または消去させ、且つ生理的活性を高度に維持せしめた修飾ポリペプチド類であり、患者の病気の治療に極めて有効であると考えられる。

(1) 1 mMのエチレンジアミン四酢酸、0.01 MのトリトンX-100、0.01 Mの尿酸を含む0.05 Mのホウ酸緩衝液(pH8.5) 2.0 mlに対し、蒸留水0.5 ml、酵素溶液0.5 mlを加え、25℃で5分間酵素反応を行なう。反応は20 Mカセイカリ溶液0.2 mlを加え、停止させる。ブランク試験は蒸留水2.0 ml、水0.5 mlに20 Mカセイカリ溶液0.2 mlを加え、これに酵素溶液を加えて行なう。両者の290 nmにおける吸光度の差から酵素活性を求めた。1分間に尿酸1 μmolを分解する酵素活性を1ユニットとする。

(2) L-アスパラギナーゼおよび修飾L-アスパラギナーゼ；アスパラギン酸-β-P-ニトロアニリドを基質とする分光学的方法(A. Melster等、J. Biol.-Chem., 215, 441-460 (1955))で行なつた。

(3) フェニルアラニンアンモニリアーゼ及び修飾フェニルアラニンアンモニリアーゼ；Zucker等の方法[M. Zuckeretal, Plant

以下、比較例および実施例において本発明を具体的に説明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。

なお、以下の比較例および実施例において、ポリエチレングリコール誘導体の数平均分子量および多分散度、ポリペプチド類および修飾ポリペプチド類の活性、修飾ポリペプチド類の活性残存率、蛋白質、修飾ポリペプチド類のアミノ基の修飾率、抗原性等の測定は下記の方法で行なつた。

#### 数平均分子量

末端基測定法：片末端の封鎖されたポリエチレングリコールの末端水酸基濃度を常法〔日本分析化学会編分析化学便覧改訂二版1095(1971)〕により測定し数平均分子量を算出した。

#### 多分散度

数平均分子量の算出に用いたと同様の条件によるゲル浸透クロマトグラフィーの示差屈折曲線と常法により多分散度を算出した。

#### 酵素類の活性

(1) ウリカーゼ及び修飾ウリカーゼ；基質溶液

Physiol., 40, 779 (1965))に従つて行なつた。

(4) カタラーゼ及び修飾カタラーゼ；Beers等の方法〔R. F. Beers, Jr., I. W. Sizer, J. Biol. Chem., 195, 133 (1952)〕で測定した。

#### 修飾ポリペプチド類の活性残存率

修飾ポリペプチド類の比活性と未修飾ポリペプチド類の比活性の比を求めて算出した。

#### 蛋白質量

ビウレット法で測定した。

#### アミノ基の修飾率

Habeebの方法〔A. F. S. A. Habeeb, Anal. Biochem., 14, 328 (1966)〕により修飾ポリペプチド類の未反応アミノ基量を測定し、未修飾ポリペプチド類のアミノ基量の比からアミノ基の修飾率を算出した。

#### 抗原性試験

1) リングテスト

未修飾ポリペプチド類をウサギに免疫して得た抗血清の2倍希釈液を50 μlずつ比降

管に入れ、その上に修飾ポリペプチド試料の0.2mg蛋白/ml・リン酸緩衝液pH5.0を重層し、室温で放置して重層直後より3時間までに沈降線の認められたものを陽性とし、抗血清の何倍希釈液まで陽性であるかを2次の値で示した。

## 2) オクタロニーテスト

1多アジ化ナトリウムを含む1多層天板に穴をあけ、リングテストに用いたと同様の抗血清原液10μlと修飾ポリペプチド試料の2.0mg蛋白/ml・リン酸緩衝液pH5.0を入れ、室温で反応させ、24時間後に沈降線の現われたものを陽性とした。

## 比較例 1.

過流冷却器、攪拌装置を取りつけた2lの三口フラスコに数平均分子量2215(末端基法)、多分散度1.44のモノメトキシポリエチレングリコール44.3gr(0.02モル・末端基法)、無水炭酸ナトリウム20gr、ベンゼン800ml、水4mlを仕込み過流下に加熱し、モノメトキシポリエ

チレングリコールを溶解させた。室温に放冷後、塩化シアヌル11.06gr(0.06モル)を粉末で添加し、室温で18時間反応せしめた。溶液を戸過後、戸液を1lの石油エーテルに投入し、析出した沈殿を捕集した。沈殿を800mlのベンゼンに溶解し、1lの石油エーテル中に投入する再沈殿精製操作を5回繰返したのち減圧乾燥を行なつて2-O-メトキシポリエチレングリコール-4,6-ジクロロ-ε-トリアジン主成分とする反応物を得た。

カンジダ・ユナリス由来のウリカーゼ(分子量12万)20mgを4mlの0.1M-ホウ酸緩衝液に4℃で溶解させ、攪拌下に上記操作で得られた2-O-メトキシポリエチレングリコール-4,6-ジクロロ-ε-トリアジンの種々量を固形で添加し、4℃で30分間攪拌を続けたのち、40mlの0.1M-リン酸緩衝液(pH7.35)で希釈し、アミコンの限外戸過膜XM-50を用いて限外戸過を行ない未反応物を除去した。このようにして得られた修飾ウリカーゼのウリカーゼ活性、全アミノ

基中の修飾を受けたアミノ基の割合(修飾率)、抗原性を第1表に示す。

## 比較例 2.

数平均分子量4348(末端基法)、多分散度1.31のモノメトキシポリエチレングリコールを用いて比較例1と同様の原料仕込みモル比、反応条件により2-O-メトキシポリエチレングリコール-4,6-ジクロロ-ε-トリアジンを主成分とする反応物を得た。これを用いて比較例1と同様の操作で修飾ウリカーゼを得た。この修飾ウリカーゼの各種試験結果を第1表(a)に示す。

以下余白

第 1 表 (a)

例	モノメトキシポリ エチレングリコール		アミノ基 の修飾率 (%)	酵素活性 保 持 率 (%)	抗 原 性		
	数平均分子量	多分 散度			リンノ アス) × 2.5	オクタ ロー	
比較 例 1	2215	<del>1440</del>	144	0	100	5	+
				18	53	5	+
				23	32	4	+
				26	24	3	+
				29	20	2	+
				47	17	—	—
				50	4	—	—
比較 例 2	4348	<del>1440</del>	131	0	100	5	+
				17	52	5	+
				21	30	3	+
				24	25	2	+
				26	21	—	—
				44	16	—	—
				47	4	—	—

## 実施例 1.

数平均分子量5000以上の多分散度の異なるモノメトキシポリエチレングリコールから比較例1と同様の反応により、各種2-O-メトキシポリエチレングリコール-4,6-ジクロロ-ε-トリ

アジンを得た。これを用いて比較例1と同様の修飾反応で各種修飾ウリカーゼを得た。この修飾ウリカーゼの試験結果を第1表(b)に示す。

第1表(b)

実施例1	モノノトキシポリエタレングリコール		アミノ基の修飾率(%)	酵素活性保持率(%)	抗原性	
	数平均分子量(末端基法)	多分散度			リンゲテスト×2.5	オットロムニ
A	6912	1.38	0	100	5	+
			10	73	4	+
			18	63	2	+
			23	60	1	+
			24	37	—	—
B	7120	1.03	0	100	5	+
			12	81	3	+
			18	66	1	—
			24	32	—	—
			26	40	—	—
C	9600	1.40	0	100	8	+
			17	73	3	+
			21	82	1	+
			24	81	—	—
D	9510	1.02	0	100	5	+
			18	73	2	+
			19	63	—	—
			22	53	—	—
E	13260	1.42	0	100	5	+
			18	74	3	+
			20	61	1	+
			23	50	—	—
F	13420	1.05	0	100	6	+
			14	76	2	+
			18	63	—	—
			21	52	—	—

## 比較例3.

E. コーリ由来のL-アスパラギナーゼ10mgを2mlのホウ酸緩衝液(pH9.2)に溶解させた溶液を4℃に保ち、この溶液に比較例1および比較例2の反応で得られた2-O-メトキシポリエタレングリコール-4,6-ジクロロ-ε-トリアジンの種々量を加し、4℃で1時間攪拌を行なったのち比較例1と同様の操作で修飾L-アスパラギナーゼを得た。この様にして得られた修飾L-アスパラギナーゼの各種試験結果を第2表(a)に示す。

以下余白

第2表(a)

比較例1	モノノトキシポリエタレングリコール		アミノ基の修飾率(%)	酵素活性保持率(%)	抗原性	
	数平均分子量(末端基法)	多分散度			リンゲテスト×2.5	オットロムニ
A	2216	1.44	0	100	5	+
			40	20	4	+
			80	18	3	+
			61	13	3	+
			72	7	2	+
			81	8	2	+
			93	1	1	+
B	4348	1.31	0	100	5	+
			40	19	4	+
			61	14	2	+
			59	12	2	+
			71	8	—	—
			80	3	—	—
			90	1	—	—

## 実施例2.

実施例1で得られた各種2-O-メトキシポリエタレングリコール-4,6-ジクロロ-ε-トリアジンをを用いて比較例3と同様操作で修飾L-アスパラギナーゼを得た。この修飾L-アスパラギ

ナーゼの各種試験結果を第2表(b)に示す。

第2表(b)

実施例2	モノノトキシポリエタレングリコール		アミノ基の修飾率(%)	酵素活性保持率(%)	抗原性	
	数平均分子量(末端基法)	多分散度			リンゲテスト×2.5	オットロムニ
A	6912	1.38	0	100	6	+
			50	14	3	+
			65	10	1	+
			68	8	—	—
B	7120	1.03	0	100	5	+
			51	13	—	—
			64	9	—	—
			73	6	—	—
C	9600	1.40	0	100	5	+
			40	18	1	+
			60	14	—	—
			60	12	—	—
D	9510	1.02	0	100	6	+
			31	28	1	+
			34	21	1	+
			41	18	—	—



第 3 表 (a)

比較例 4	モノメトキシポリエタレングリコール		アノ高 O 修飾率 (%)	酵素活性 保 持 率 (%)	試 原 性	
	数平均分子量 (末端高直)	多分散度			リソ アミ X2E	エタノ ロー
A	2218	1.44	0	100	5	+
			32	38	5	+
			41	18	3	+
			53	12	3	+
			62	8	2	+
			70	2	1	+
B	4348	1.31	0	100	5	+
			40	20	3	+
			51	15	2	+
			61	6	1	+
			69	3	1	+

## 比較例 4.

比較例 1、2 の反応で得られた 2-O-メトキシポリエタレングリコール-4,6-ジクロロ-8-トリアジンを用いて、R. グルテニス由来のフェニルアラニンアンモニアラーゼの化学修飾を下記方法で行なった。

フェニルアラニンアンモニアラーゼ 10 単位を 5 ml の 0.05 M - ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解させ、25℃ に保つ。酵素量の 2-O-メトキシポリエタレングリコール-4,6-ジクロロ-8-トリアジンをこの溶液に添加し、15 分間攪拌を続けた。その後反応混合物を XM-50 膜で限外ろ過し、修飾フェニルアラニンアンモニアラーゼを得た。このものの各種試験結果を第 3 表 (a) に示す。

以下余白

## 実施例 3.

実施例 1 の各種 2-O-メトキシポリエタレングリコール-4,6-ジクロロ-8-トリアジンを用い、比較例 4 と同様の方法で修飾フェニルアラニンアンモニアラーゼを得た。このものの各種試験結果を第 3 表 (b) に示す。

第 3 表 (b)

実施例 3	モノメトキシポリエタレングリコール		アノ高 O 修飾率 (%)	酵素活性 保 持 率 (%)	試 原 性	
	数平均分子量 (末端高直)	多分散度			リソ アミ X2E	エタノ ロー
A	6912	1.38	0	100	5	+
			42	18	2	+
			52	14	1	+
			59	6	1	+
			72	2	-	+
B	7120	1.03	0	100	5	+
			45	17	1	+
			56	13	1	+
			68	4	-	+
			72	2	-	-
C	9600	1.40	0	100	5	+
			44	17	1	+
			56	14	1	+
			63	5	-	-
			70	3	-	-
D	9310	1.02	0	100	5	+
			43	18	-	-
			55	14	-	-
			64	5	-	-
			71	2	-	-

## 比較例 5.

比較例 2 の反応で得られた 2-O-メトキシポリエタレングリコール-4,6-ジクロロ-8-トリアジンを用いて、牛の肝臓由来のカタラーゼの修飾を下記操作で行なった。

カタラーゼ 500 単位を 50 ml の 0.1 M - ホウ酸緩衝液 (pH 9.2) に 4℃ で溶解させ、この溶液を攪拌しながら 11.3 ml の 2-O-メトキシポリエタレングリコール-4,6-ジクロロ-8-トリアジンを粉末状態で加えた。4℃ で 1 時間攪拌したのち、大量の 0.01 M - リン酸緩衝液を用いて、XM-50 膜による限外ろ過を行ない未反応の 2-O-メトキシポリエタレングリコール-4,6-ジクロロ-8-トリアジンを除去した。この化学修飾カタラーゼを 100 パーボレート単位ずつ 1 群 2 匹から成る 10 匹の無カタラーゼマウスに静脈投与し、一定時間毎に 2 匹ずつのマウスから採血し、Feinstein (R. N. Feinstein, J. Biol. Chem., 180, 1197 (1949)) の方法で血中のカタラーゼ活性を測定したところ、3 日以内に活性がみ

られなくなった。

実施例 4.

実施例 1. に用いた数平均分子量 9510 (末端基法) ~~0.5-2.5 (GPC法)~~ 多分散度 1.02 のモノメトキシポリエテレングリコールから得られた 2-O-メトキシポリエテレングリコール-4,6-ジクロロ-8-トリアジンによるカタラーゼの修飾を比較例 5 と同様の反応で行なった。この修飾カタラーゼの 100 パーセント単位を比較例 5 と同様の方法でマウスに静脈投与したところ、10 日目ではじめて血中のカタラーゼ活性が消失した。

特許出願人 東洋紡績株式会社